



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0088162
(43) 공개일자 2008년10월02일

(51) Int. Cl.

A61K 36/704 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0030721

(22) 출원일자 2007년03월29일

심사청구일자 2007년03월29일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

김호철

서울 동대문구 회기동 65번지 신현대아파트 2동 1404호

부영민

서울 강동구 고덕1동 현대아파트 103-705

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

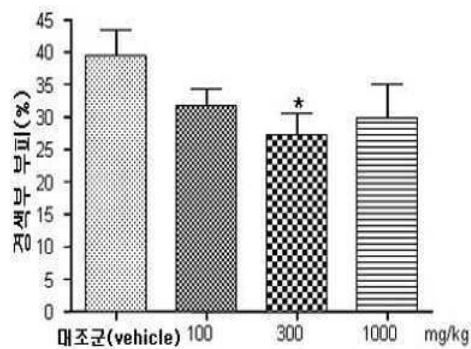
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 호장근 추출물을 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 호장근 추출물을 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 호장근 추출물은 감각 운동 기능 증진 효과 및 신경 보호 효과가 있으므로 신경 보호용 약적 조성물 또는 건강식품에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김진모

전북 전주시 완산구 중화산동2가 545 13/3

김미연

서울 성북구 길음2동 길음뉴타운 224-1401

김윤태

인천 부평구 산곡2동 한화아파트 102동 1406호

특허청구의 범위

청구항 1

호장근 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 추출을 위한 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물인 것을 특징으로 하는 신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 알코올은 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올인 것을 특징으로 하는 신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올인 것을 특징으로 하는 신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 알코올은 메탄올인 것을 특징으로 하는 신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 허혈성 뇌질환의 예방 및 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는 신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펠트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 신경 보호용 약학적 조성물.

청구항 8

호장근 추출물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<7> 본 발명은 호장근 추출물을 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 감각 운동 기능 증진 효과 및 신경 보호 효과를 갖는 호장근 추출물을 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물 또는 건강식품에 관한 것이다.

<8> 중풍(stroke)은 현재 세계적으로 1년에 약 450만명이 사망하는 제 3위의 사망원인 질환이며 현재 국내에서 조사한 통계에 비추어 보아도 단일질환으로는 제 1위를 차지하고 있다(경제기획원 조사통계국: 사망원인 통계연보, 경제기획원, 1999; Warlow CP. *Epidemiology of stroke*, *Lancet*, 352(Suppl. I11), 1-6, 1998). 중풍의 치료는 발병 초기 즉, 3 시간 이내에는 혈전용해제 등을 사용하여 혈류를 다시 회복시키는 방법(The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*. 333, 1581-1587, 1995)을 사용하는 동시에 신경세포의 손상을 최소화하기 위한 신경 보호제를 사용하고 있다. 그러나 아직 신경 보호 효능을 가진 효과적인 치료제는 개발되어 있지 않다. 이러한 치료제를 개발하기 위해서 동물 모델을 많이 사용하고 있다. 동물 모델은 크게 2가지, 전뇌허혈과 국소뇌허혈로 구별하여 연구되어지고 있다(Lipton P, *Physiol Rev*, 79, 1431-568, 1999).

- <9> 중풍은 여러 가지 기전으로 세포손상을 발생하는데, 중풍모델에서의 뇌손상은 손상된 뇌 부위의 지배 신체 영역의 기능부전이 유발되는데, 중풍에 대한 신경 보호 효과가 있는 약제의 약효를 평가할 때 뇌손상측정과 더불어 감각 운동 기능을 평가하는 것이 중요하다(Zhang L, *et. al.*, *J Neurol Sci*, 174, 141-146, 2000). 국소뇌허혈 모델은 뇌손상으로 인한 인지기능 부전과 감각운동 기능의 부전의 형태로 신체 기능에 대한 손상이 발생하는데, 이 모델의 뇌손상의 특성상 중대뇌동맥 지배영역인 대뇌피질과 꼬리조가비핵(caudoputamen)의 손상으로 인하여 감각 운동 기능 실조가 뚜렷하다. 대뇌피질은 감각운동의 중추이고, 꼬리조가비핵(caudoputamen)은 대뇌피질에서의 신경 신호를 받아 전달하는 전달의 중추로서, 이 부위들이 손상을 받으면 사지의 감각 기능 및 운동 기능의 실조가 발생하는 것으로 알려져 있다(Tamura A, *et. al.*, *J Cereb Blood Flow Metab.* 1, 53-60, 1981; DeVries AC, *et. al.*, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 25, 325-342, 2001).
- <10> 호장근은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 본초인 호장과 동속근연식물의 근경(根莖)과 근(根)을 봄에 채취하여 수근(鬚根)을 제거하고 세정하여 건조한 것이다(全國韓醫科大學本草學教授共編著: 本草學, 永林社, pp.420-421, 1995; 대한약전 및 대한약전의 한약규격 주해, pp.678-679). 우리나라에 생육하는 호장근은 호장(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.), 왕호장(*P. sachalinensis* Fr. Schm.) 및 둥근잎호장(*P. ellipticum* Migo)의 3종이 있으나 식물자원에는 호장과 왕호장 2종만이 기록되어 있다(李昌福: 서울大學校 論文集 生農系 第20輯 p89, 1969). 호장근은 명의별록(名醫別錄)에 미온(微溫), 주통리월수(主通利月水), 파유혈정결이라고 수록(인민위생출판사: 명의별록 pp.228-229, 1986)된 이래 대충장(藥性論), 고장(本草拾遺), 산장·반장(日華子本草) 또는 반장근(嶺南本草, 진남본초) 등의 다른 이름(중약대사전 편찬위원회: 중약대사전, 정담, pp.4859-4863, 2005)으로 불리고 있다. 호장근은 고산(苦酸), 미한(微寒)하며 간담폐경(肝膽肺經)으로 들어가 거풍이습(祛風利濕), 산어정통(散瘀定痛), 지해화담(止咳化痰), 사하통변(瀉下通便), 청열해독(淸熱解毒)의 효능(全國韓醫科大學本草學教授共編著: 本草學, 永林社, pp.420-421, 1995; 한방약리학교재편찬위원회: 한방약리학, 신일상사, pp.469-472, 2006)이 있어서 관절비통(關節痺痛), 습열황달(濕熱黃疸), 경폐(經閉), 해수담다(咳嗽痰多), 수화탕상(水火湯傷), 질타손상(跌打損傷), 웅충창독(癰腫瘡毒), 열결변비(熱結便秘)를 치료한다(全國韓醫科大學本草學教授共編著: 本草學, 永林社, pp.420-421, 1995; 대한약전 및 대한약전의 한약규격 주해, pp.678-679).
- <11> 호장근의 주요 성분은 페놀(phenol) 화합물, 스틸벤(stilbene) 유도체, 안트라퀴논(anthraquinone) 유도체, 플라보노이드(flavonoid) 화합물들이며 에모딘(emodin), 에모딘 8-O-β-D-글루코피라노사이드(emodin 8-O-β-D-glucopyranoside), 레스베라트롤(resveratrol), 폴리다틴(polydatin; piceid), 파손(physcion), 크리소파놀(chrysophanol), 레인(rhein), 안트라글리코사이드 A(anthraglycoside A), 안트라글리코사이드 B(thraglycoside B), 펠라시놀(fallacinol), 퀘스티놀(questinol) 등이 보고 되어지고 있다(全國韓醫科大學本草學教授共編著: 本草學, 永林社, pp.420-421, 1995; 한방약리학교재편찬위원회: 한방약리학, 신일상사, pp.469-472, 2006; Huang TK. "A Handbook of the Composition and Pharmacology of Common Chinese Drugs," pp. 1222-1226, 1994; "Zhonghua Bencao," Vol. II, Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, pp. 653-658, 1999; Guangsheng Qian, *et. al.*, *Chem. Pharm. Bull*, 54(8), 1179-1186, 2006).
- <12> 호장근의 약리작용으로는 항심근허혈, 항염증작용(Tae Cheool Rho, *et. al.*, *Kor. J. Pharmacogn.* 32(3), 181-188, 2001), 골다공증에 대한 치료효과(Bagchi D., "Resveratrol and Human Health" Keats Publishing, Los Angeles, 2000; Bagchi D, *et. al.*, *Drugs Exp Clin Res.* 27, 233-248, 2001), 항콜레스테롤작용, 항암작용(Jayasuriya H, *et. al.*, *J. Nat. Prod.*, 55, 696-698, 1992; Feng L, Zhang LF, *et. al.*, *Zhong Yao Cai.* 29(7), 689-91, 2006), 혈관신생억제작용(이태규 외, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46(1), 50-54, 2003), 항 간염바이러스 작용(Jung-San Chang, *et. al.*, *Antiviral Reserch*, 66(1), 29-34, 2005), 항균효과, 항천식 작용(Wang Y, *et. al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 431-435 2002), 거담작용(Zhu YP. *et. al.*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands, pp.463-465, 1998)등이 보고 되어 있다.
- <13> 호장근의 성분중 레스베라트롤(resveratrol) 및 그 이성질체인 폴리다틴(polydatin)의 경우에 중풍 모델에서 신경 보호 효과가 증명된 바 있지만(Cheng Y, *et. al.*, *Brain Res.* 19, 1110(1), 193-200, 2006), 이들 성분의 경우 호장근에만 있는 성분들이 아니고, 포도주 등의 식품들에서 연구가 진행된 경우이다.
- <14> 이에, 본 발명자들은 천연물에서 신경 보호용 조성물을 검색하던 중, 호장근 추출물의 감각 운동 기능 증진 효과 및 신경 보호 효과를 확인하여 신경 보호용 약학적 조성물로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<15> 본 발명의 목적은 호장근 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<16> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 호장근 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물을 제공한다.

<17> 또한, 본 발명은 호장근 추출물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

<18> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<19> 본 발명은 호장근(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et. Zucc.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 신경 보호용 약학적 조성물을 제공한다.

<20> 본 발명자들은 호장근을 추출, 여과한 뒤 여과액을 농축 및 동결 건조하여 호장근 추출물을 수득하였다. 더욱 구체적으로는 건조된 호장근에 용매를 첨가하여 초음파 추출하고 여과지로 여과하여 감압농축 및 동결 건조하여 호장근 추출물을 수득하였다. 상기 호장근은 재배한 것 또는 시판되는 것 등에 제한 없이 이용될 수 있으며, 호장근의 뿌리인 것이 가장 바람직하다. 추출을 위한 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 상기 알코올은 바람직하게는 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올, 보다 바람직하게는 메탄올이다. 추출은 초음파를 이용하였으나 당해업계에 알려진 어떠한 방법을 이용하여도 무방하고 1 ~ 5회 반복 추출하는 것이 바람직하다. 상기와 같은 방법으로 수득한 호장근 추출물을 "PC"(*Polygonum cuspidatum*)라고 명명하였으며 3차 증류수에 녹여 본 발명의 시료로 이용하였다.

<21> 본 발명자들은 뇌손상으로 인한 감각 운동 기능 실조에 대한 호장근 메탄올 추출물(PC)의 보호 효과를 국소뇌허혈 흰쥐에서 근력, 균형감과 자발운동 기능을 발런스 빔(Balance beam) 테스트(표 1 참조)를 수행함으로써 확인하였다. 일시적 국소뇌허혈은 관내 봉합(Intraluminal suture) 방법을 이용하여 수컷 스프래그-돌리(Sprague-Dawley) 흰쥐에서 유발시켰다. 국소뇌허혈 유발 전 30분 및 유발 후 90분에 호장근 메탄올 추출물(PC)을 흰쥐에 경구 투여한 군은 대조군에 비하여 30%의 유의한 운동 기능 실조에 대한 보호 효과를 보였다(도 1 참조).

<22> 또한, 국소뇌허혈 흰쥐의 발런스 빔 테스트 후, 호장근 메탄올 추출물(PC)의 신경보호 효과를 확인하였다.

<23> 그 결과, 도 2에서 백색은 뇌경색 부위를 나타내며 선홍색은 정상부위를 나타내는데, 대조군에 비해 호장근 메탄올 추출물(PC) 투여군은 선홍색의 부분이 확장되는 것으로 PC가 뇌손상을 보호함을 알 수 있다. 일시적 국소뇌허혈 흰쥐 모델(2 h 패쇄 및 24 h 재관류)에서 하기의 수학적 1을 이용하여 뇌손상을 측정된 결과 대조군에 비해 PC 투여군에서 유의적인 뇌손상 보호 효과, 특히 300 mg/kg 투여군에서 유의한 보호 효과를 나타내었다(도 3 참조).

<24> 상기와 같이 호장근 추출물은 뇌손상으로 기인된 운동 기능 실조에 대한 보호 효과 및 중풍 뇌손상에 의한 신경 보호 작용의 기능이 있으므로 신경 보호용 약학적 조성물에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 상기 조성물은 허혈성 뇌질환의 예방 및 치료에 이용될 수 있고 허혈성 뇌질환에는 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 또는 쇼크 뇌손상 등이 포함된다.

<25> 본 발명의 신경 보호용 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 호장근 추출물(PC)을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 호장근 추출물(PC)을 함유하는 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<26> 신경 보호용 약학적 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

<27> 신경 보호용 약학적 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 목초액을 함유하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- <28> 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 생약 복합제 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- <29> 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <30> 신경 보호용 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 호장근 추출물(PC)은 1일 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 1000 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <31> 호장근 추출물(PC)은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- <32> 또한 본 발명은 호장근 추출물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- <33> 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 기재된 각각의 성분 또는 이의 혼합물은 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 호장근 추출물을 식품 또는 음료 제조 시에 원료에 대하여 1 내지 50 중량%, 바람직하게는 10 내지 30 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 본 발명의 호장근 추출물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- <34> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미의 건강식품을 모두 포함한다.
- <35> 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 상세히 설명한다. 단 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <36> <실시예 1> 호장근 추출물의 제조
- <37> 호장근은 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et. Zucc.의 뿌리를 사용하였다. 약재는 동우당제약에서 구입하여 경희대학교 한의과대학 본초학교실의 검증을 받아 건조시켜 실험에 사용하였다. 호장근 건조약재 100 g에 85% 메탄올 1,500 ml를 가하여 120분 동안 초음파 추출하여 여과지로 여과한 후 재차 85% 메탄올 1,000 ml를 가하여 90분간 초음파 추출한 후 여과지로 여과하였다. 처음 여과액과 2차 여과액을 합하여 감압농축시킨 후 동결 건조하여 고형추출물을 수득하였다. 이러한 방법으로 호장근 건조약재 6 kg에서 1,080 g의 조추출물[하기 "PC"(*Polygonum cuspidatum*)라 명명함]을 수득하였다. 중대뇌동맥 국소뇌허혈 실험에 사용된 시료는 3차 증류수에 녹여 사용하였다.
- <38> <실시예 2> 중풍 모델의 제조
- <39> <2-1> 실험동물의 준비
- <40> 중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐 모델은 체중 180 ~ 200 g의 샘타코(주)에서 구입한 수컷 스프래그-돌리(Sprague-Dawley) 흰쥐를 온도는 $22.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50 \pm 10\%$ 조건으로 유지된 실험실에서 낮과 밤의 주기는 각각 12 시간 유지하여 적응시켰고 물과 사료를 충분히 공급하면서 사육하여 체중 200 ~ 220 g이 될 때 구별하여 수

술 전 날 물만 공급하여 실험에 사용하였다.

<41> <2-2> 국소뇌허혈 흰쥐 모델 제조

<42> Zea-Longa 등의 방법(Zea Longa EL, *et. al.*, Stroke. 20, 84-91, 1989)을 응용한 관내 봉합 (Intraluminal suture) 방법을 사용하여 상기 <2-1>에서 준비한 흰쥐에 일시적 국소뇌 허혈을 유발하였다. 23 mm의 4-0 나일론 봉합사(Dafilon[®], Malaysia)의 끝부분에서 약 5 ~ 10 mm 길이를 실리콘(Xantopren, Bayer Dental, Germany)과 경화유(Xantopren activator, Bayer Dental, Germany)를 혼합하여 지름이 0.28 ~ 0.30 mm 가 되도록 코팅하여 실험에 사용하였다.

<43> 수술 30분 전에 약물을 경구투여하고 흰쥐를 70% N₂O와 30% O₂가 섞인 혼합가스에 5%의 아이소플로레인 (isoflourane)으로 전 마취한 후, 목 전방 부위 중양을 피부 절개한 후 오른쪽 총경동맥(common carotid artery)과 외경동맥(external carotid artery)을 주위조직과 신경들로부터 조심스럽게 분리하였다. 실로 총경동맥을 결찰하고 외경동맥 분지인 상부갑상선동맥과 후두동맥을 전기소작술로 소작하고 내경동맥(internal carotid artery)의 분지인 익돌근 구개동맥을 전기소작하고 외경동맥을 자르고 프로브(probe)를 외경동맥에서 내경동맥으로 삽입하되 총경동맥분지에서 약 17 ~ 18 mm 정도 삽입한 후 실로 고정하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 자연회복시켰다. 2 시간 MCAo(Middle cerebral artery occlusion)유발 후 재관류하였다. 모든 수술과정은 아이소플로레인(isoflourane)을 3%로 유지하면서 수술현미경하에서 시행하였으며, 허혈을 유발시키는 동안과 재관류 및 회복기 동안, 체온이 38 ± 1 °C이하로 떨어지지 않도록 체온유지장치(Harvard apparatus, Holliston, MA, USA)를 사용하였다.

<44> <실험예 1> 호장근 메탄올 추출물의 감각 운동 기능 증진 효과

<45> <1-1> 호장근 추출물 투여

<46> 일시적 국소뇌허혈에 대한 호장근 추출물(PC)의 감각 운동 기능 증진 효과를 측정하기 위하여, 호장근 추출물을 3차 증류수에 용해시켜 상기 실시예 2에서 준비된 국소뇌허혈 흰쥐에 뇌허혈 유발 전 30분 및 유발 후 90분에 100, 300 및 1,000 mg/kg의 용량을 2회 경구 투여하였다. 대조군으로는 3차 증류수를 경구 투여하여 사용하였다.

<47> <1-2> 발런스 빔 테스트(Balance beam test)

<48> 상기 실험예 <1-1>과 같이 국소뇌허혈 유발 전 30분 및 유발 후 90분에 호장근 추출물(PC)을 흰쥐에 2회씩 경구 투여하고 대조군에는 같은 방법으로 3차 증류수를 경구 투여한 후, 국소뇌허혈이 유발된 지 23 시간이 경과 한 후에 Soblosky 등(Soblosky JS, *et. al.*, Behaviorral Brain Research, 79, 79-92, 1996)의 방법을 변형하여 발런스 빔 테스트(Balance beam test)를 실시하였다. 너비 3 cm, 길이 150 cm의 나무로 된 봉을 바닥에서 약 15 cm 높이에 걸쳐 놓고, 흰쥐를 봉의 중심에 균형을 잡게 놓은 후 30초 동안 흰쥐의 행동을 보고 3명의 관찰자가 그 점수를 매겼다. 점수의 평가기준은 하기의 표 1과 같이 정하여 실시하였다. 각각의 흰쥐 한 마리당 매 3회 실시하여 평균값을 수치로 사용하였다. 통계 처리는 시험관 내 실험(*in vitro*)의 경우에는 평균 ± SD(Standard Deviation)로, 생체 내 실험(*in vivo*)일 경우는 평균 ± SEM(Standard error of the mean)으로 나타내었고, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's *t*-test로 검정하여 *p*값이 0.05% 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였으며, 하기의 통계처리도 모두 이와 같이 하였다.

<49> 그 결과, 가수술군(Sham)은 5.0 ± 0.05 점을 받은 반면, 대조군은 0.9 ± 0.3 점을 받아 뇌 손상 후 감각 운동 기능의 실조를 보였고, 호장근 추출물(PC) 300 mg/kg 투여군은 2.1 ± 0.26 점을 보여 대조군에 비하여 30%의 유의한 운동 기능 실조에 대한 보호 효과를 관찰할 수 있었다(도 1).

표 1

<50> 발런스 빔 테스트에서의 점수

점수	상태
0점	30초간 봉에서 균형을 유지할 수 없는 상태
1점	30초 이상 봉에서 균형을 유지할 수 있는 상태
2점	1점 + 봉의 길이 방향으로 몸을 트는 상태
3점	2점 + 봉의 길이 방향으로 몸이 완전히 올라온 상태

4점	3점에서 1step 정도 움직이는 상태
5점	3점에서 2step 정도 움직이는 상태
6점	3점에서 3step 정도 움직이는 상태
7점	자유롭게 움직이는 상태

<51> <실험예 2> 호장근 메탄올 추출물의 신경 보호 효과

<52> 호장근 메탄올 추출물(PC)의 신경 보호 효과를 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 하였다.

<53> 국소뇌허혈 흰쥐에 상기 실험예 <1-1>과 같이 호장근 추출물(PC) 및 증류수를 투여하고 제관류하여 상기 실험예 <1-2>의 발렌스 빔 테스트를 수행한 후에 마취약(chloral hydrate 400 mg/kg)으로 마취시켜 2분 이내에 뇌를 적출하여 뇌 해부 지침(brain dissection guide)(Harvard Instruments Large Rat Brain Matrix, Coronal, #52-4512c)을 이용하여 정수리 지점으로부터 +3 mm의 부위에서부터 2 mm 두께로 절편하여 총 6개의 절편으로 나누었다. 이 절편들을 2% TTC(2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride)가 들어있는 16 웰 플레이트(well plate)에 조직을 충분히 담그고 37℃에서 30분 동안 염색한 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시켜 조직을 관찰하였다.

<54> 각각의 투여군에서 고정된 6개의 조직을 디지털 카메라(OLYMPUS, c2500, Japan)로 하나씩 촬영하였다(도 2). 중대뇌동맥 일정시간 폐쇄 후 24시간에 TTC로 염색하면 뇌경색 부위와 정상부위는 각각 백색과 선홍색으로 염색된다. 이 모델에서의 뇌손상 조직학적인 결과는 뇌경색 중심부와 주변부로 나누는데 뇌경색 중심부는 측두/정수리 부분의(temporal/parietal) 피질 및 선조체(striatum) 부위이며 괴사 형태로 세포가 사멸한다. 주변부는 괴사의 형태보다 천천히 세포가 사멸하는 것으로 알려져 있다.

<55> 상기 촬영한 이미지를 컴퓨터로 옮겨서, 이미지 분석프로그램(Optimas 6.51 Media cybernetics, USA)에서 제공하는 부피 측정법으로 뇌 조직 손상부의 부피를 계산하였다. 뇌부종을 제외한 우반구의 정확한 뇌경색 부피를 측정하기 위해 실제 조직 손상부위를 손상 받지 않은 좌반구 전체의 비율(수학적 1)로 계산하였다(Soblosky JS, et. al., Behavior Brain Research, 79, 79-92, 1996). 그 결과, 호장근 추출물(PC)을 100, 300 및 1,000 mg/kg의 용량으로 뇌허혈 유발 전 30분 및 유발 후 90분에 투여한 군에서 각각 31.67% ± 2.8%, 27.30% ± 3.34% 및 32.34% ± 5.41%의 뇌손상을 보였다. 300 mg/kg까지는 용량 의존적으로 손상이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 1,000 mg/kg에서는 다시 증가하는 경향이 있었다(도 3).

<56>

수학식 1

<57> (허혈이 유발되지 않은 좌반구의 부피) - (허혈이 유발된 우반구의 조직손상이 없는 부위의 부피) = 뇌허혈 유발로 인해 손상된 조직의 부피(㎎)

<58> (뇌허혈 유발로 인해 손상된 조직의 부피) / (허혈이 유발되지 않은 좌반구의 부피) × 100 = 전체 뇌반구에서의 허혈로 인한 조직손상 부피(%)

<59> 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<60> <제제예 1> 약학적 제제의 제조

<61> <1-1> 산제의 제조

<62> 호장근 추출물(PC) 2 g

<63> 유당 1 g

<64> 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<65> <1-2> 정제의 제조

<66> 호장근 추출물(PC) 100 mg

<67> 옥수수전분 100 mg

<68> 유 당 100 mg

<69>	스테아린산 마그네슘	2 mg
<70>	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	
<71>	<1-3> 캡슐제의 제조	
<72>	호장근 추출물(PC)	100 mg
<73>	옥수수전분	100 mg
<74>	유 당	100 mg
<75>	스테아린산 마그네슘	2 mg
<76>	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	
<77>	<1-4> 연질캡셀제의 제조	
<78>	호장근 추출물(PC)	100.0 mg
<79>	콩기름	175.0 mg
<80>	황납	45.0 mg
<81>	야자경화유	127.5 mg
<82>	대두인지질	21.0 mg
<83>	젤라틴	212.0 mg
<84>	글리세린(비중 1.24)	50.0 mg
<85>	디-소르비톨	76.0 mg
<86>	파라옥시안식향산메칠	0.54 mg
<87>	파라옥시안식향산프로필	0.90 mg
<88>	메칠바닐린	0.56 mg
<89>	상기의 성분을 혼합한 후, 황색 203호 적량의 성분이 1 캡셀 중에 함유되도록 약전 제제총칙 중 연질캡셀의 제법에 따라 제조하였다.	
<90>	<1-5> 환의 제조	
<91>	호장근 추출물(PC)	1 g
<92>	유당	1.5 g
<93>	글리세린	1 g
<94>	자일리톨	0.5 g
<95>	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	
<96>	<1-6> 과립의 제조	
<97>	호장근 추출물(PC)	150 mg
<98>	대두추출물	50 mg
<99>	포도당	200 mg
<100>	전분	600 mg
<101>	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
<102>	<제제예 2> 건강식품의 제조	

<103> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 호장근 추출물(PC)은 항산화 작용 및 신경 보호 효과가 뛰어나다. 이에, 본 발명자들은 상기 호장근 추출물(PC)을 유효성분으로 함유하는 건강식품을 하기와 같이 제조하였다.

<104> <2-1> 드링크의 제조

<105>	꿀	522 mg
<106>	치옥토산아미드	5 mg
<107>	니코틴산아미드	10 mg
<108>	엽산리보플라빈나트륨	3 mg
<109>	엽산피리독신	2 mg
<110>	이노시톨	30 mg
<111>	오르트산	50 mg
<112>	호장근 추출물(PC)	1.28 mg
<113>	물	200 ml

<114> 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 음료를 제조하였다.

<115> <2-2> 츄잉검의 제조

<116>	껌베이스	20 중량부
<117>	설탕	76.36 ~ 76.76 중량부
<118>	호장근 추출물(PC)	0.24 ~ 0.64 중량부
<119>	후르츠향	1 중량부
<120>	물	2 중량부

<121> 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 츄잉검을 제조하였다.

<122> <2-3> 캔디의 제조

<123>	설탕	50 ~ 60 중량부
<124>	물엿	39.26 ~ 49.66 중량부
<125>	호장근 추출물(PC)	0.24 ~ 0.64 중량부
<126>	오렌지향	0.1 중량부

<127> 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 캔디를 제조하였다.

발명의 효과

<128> 본 발명의 호장근 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 뇌손상으로 인한 운동 기능 실조에 대한 보호 효과 및 뇌손상 보호 효과에 의한 신경 보호 효능을 보이므로 신경 보호용 약학적 조성물 또는 건강식품으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 국소뇌허혈 흰쥐에 호장근(*Polygonum cuspidatum*) 추출물(PC) 투여 후, 발런스 빔 테스트(balance beam test)의 결과를 나타내는 그래프이다:

<2> **: $p<0.01$ 및 ***; $p<0.001$.

<3> 도 2는 국소뇌허혈 흰쥐의 2% TTC로 염색된 뇌의 두정부 단면을 촬영한 사진이다:

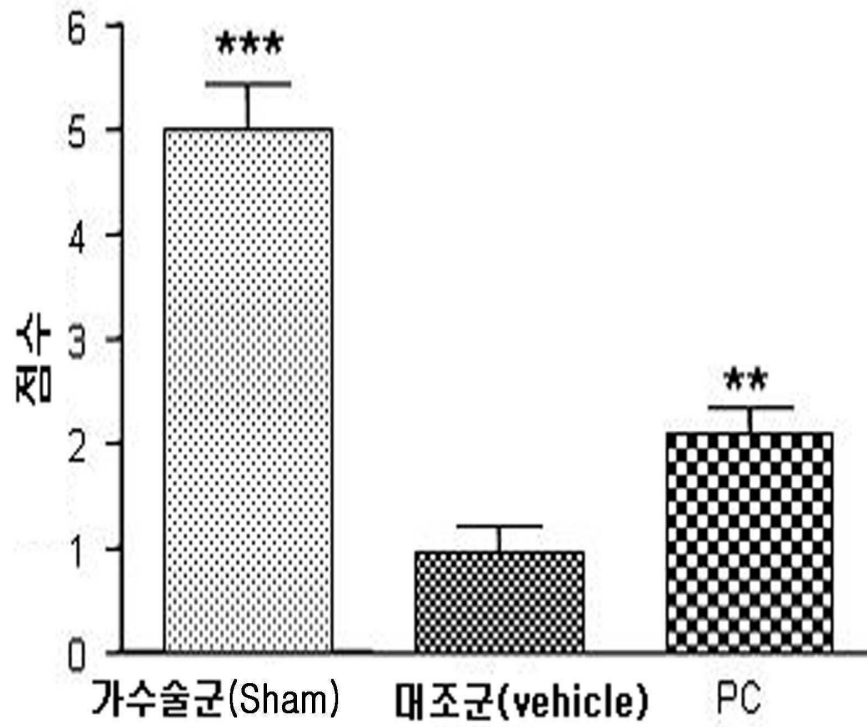
<4> 백색; 뇌경색 부위 및 선홍색; 정상부위.

<5> 도 3은 국소뇌허혈 흰쥐에서 호장근(*Polygonum cuspidatum*) 추출물(PC)의 신경 보호 효과를 나타내는 그래프이다:

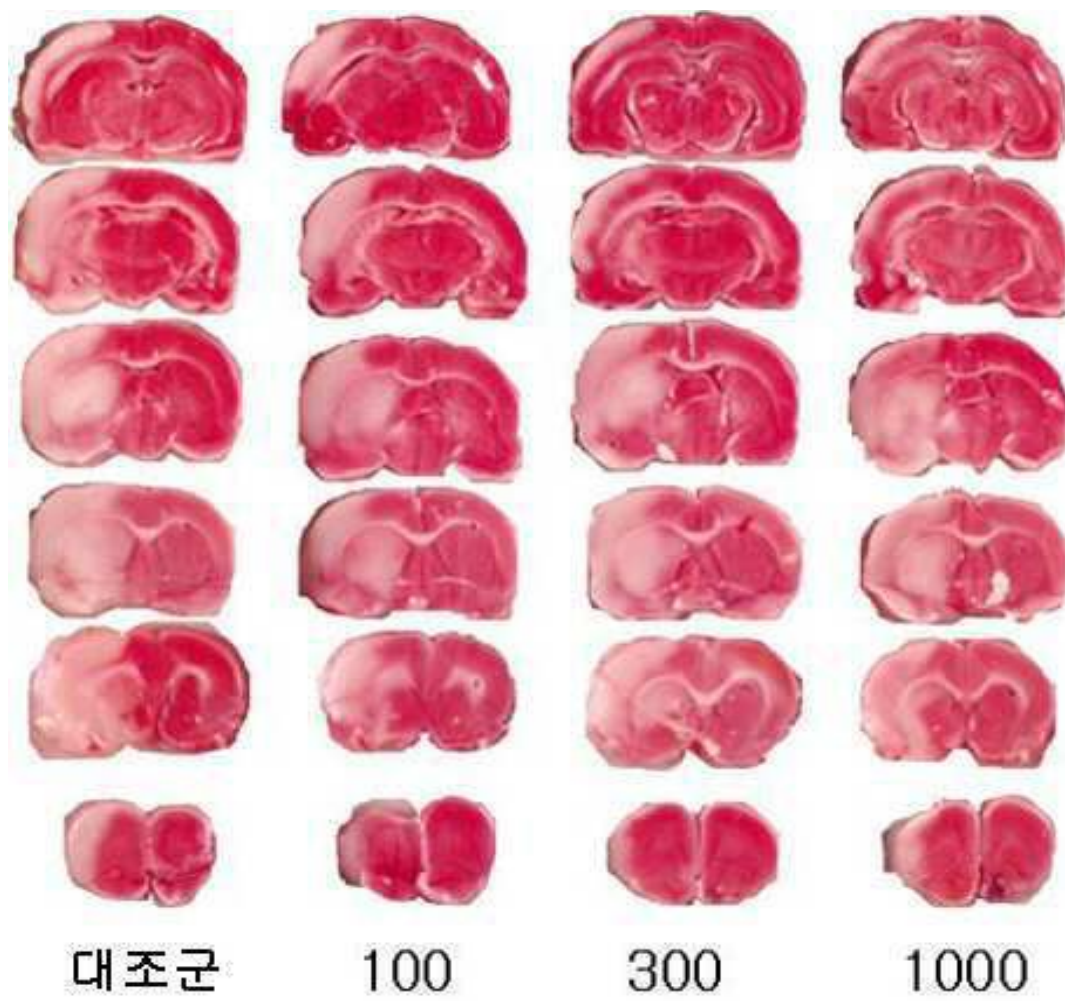
<6> *: $p < 0.05$.

도면

도면1



도면2



도면3

